

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018646

International filing date: 14 December 2004 (14.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-416556
Filing date: 15 December 2003 (15.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 5 日
Date of Application:

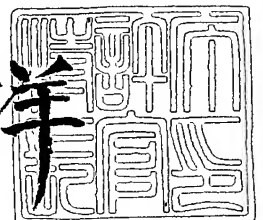
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 1 6 5 5 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 1 6 5 5 6]

出 願 人 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 Y2003-P070
【提出日】 平成15年12月15日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12P 21/02
C12N 15/09
A61K 38/17
G01N 33/53

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南 9 条西 6 丁目 1 - 3 0 - 7 0 3
【氏名】 野口 昌幸

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】
【識別番号】 100107984
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 044347
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316356

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなる A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

【請求項 2】

配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

【請求項 3】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

(a)配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b)配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 2、配列番号 4、又は配列番号 6 に示される塩基配列又はこれらの配列の一部または全部を含み、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 5】

請求項 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】

請求項 3～5 のいずれか記載の A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を、遺伝子発現ベクターに組込んで構築したことを特徴とする組換え発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 記載の組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現することを特徴とする A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドを製造する方法。

【請求項 8】

配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 9】

抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

【請求項 10】

抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤。

【請求項 12】

ポリペプチドが T C L 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 10～24 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

【請求項 13】

ポリペプチドが T C L 1 B のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 8～22 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

【請求項 14】

ポリペプチドが M T P 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 5～19 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

【請求項 15】

A k t 活性の特異的阻害が、ホスホイノシチドの A k t への結合の阻害であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

【請求項 16】

請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項 17】

抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の予防、治療のための薬剤であることを特徴とする請求項 16 記載の抗腫瘍剤。

【請求項 18】

悪性腫瘍の治療が、乳がん、肺がん、白血病、又はリンパ系腫瘍の予防、治療であることを特徴とする請求項 17 記載の抗腫瘍剤。

【請求項 19】

請求項 3～5 のいずれか記載の Akt 活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、Akt の活性を特異的に抑制する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】Akt 活性特異的抑制ポリペプチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、セリンスレオニンキナーゼAkt (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、該ペプチドをコードするDNA及び該ポリペプチドを有効成分とするAkt活性の特異的阻害剤或いは該ポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

Aktキナーゼ (Protein Kinase B: 以下、Aktと表示する。) は1990年代の初めに相次いでウイルスv-Aktとの相同性を手がかりに見つけられたセリンスレオニンリン酸化酵素である。現在までに3つのサブタイプがあることが確認されている。これらの分子は80%程度の相同性があり、当初から癌化との関連性が注目されていた。特に、サイトカインの細胞内シグナル伝達の中で細胞死を抑制する中心的な役割を担っていることがわかり注目されている (Genes & Dev., 13: 2905-2927, 1999; Annu. Rev. Biochem., 67:481-507, 1998; Biochem.J., 335: 1-13, 1998)。

【0003】

このAktは、分子量約57kDで、プレクストリン相同ドメイン (pleckstrin homology domain: PHドメイン) にイノシトールリン酸が選択的に結合し、主に細胞膜への局在を規定する役割を果たす機能をN末端に持つ。また、C末端側には、リン酸化キナーゼドメインを持つ。ホスファチディルイノシトール3-キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K) からのシグナルによりPHドメインにPIP3などが結合し、Akt分子が細胞膜に移行すること、並びにAktの三次構造を変化させることがその活性化に関与していると推測されている。

【0004】

Aktの活性化にはスレオニン308基 (Thr308)、セリン473基 (Ser473) の2つのアミノ酸のリン酸化が必須であると考えられている。Thr308はPDK (phosphoinositide dependent kinase) によりリン酸化されることが知られているが、Ser473のリン酸化のプロセスは十分に解明されておらず、ILK (integrin linked kinase) やPDK2などのいくつかの不確定な分子がそのリン酸化のプロセスに関与している可能性が推測されているに過ぎない。また、最近Ser473のリン酸化に自己リン酸化が可能性も報告されている。

【0005】

活性化されたAktは細胞死抑制に関与する分子のリン酸化を促進することが知られている。このAktによりリン酸化されるセリン/スレオニン近傍のアミノ酸配列はRXRXXS/Tとして知られている (J. Biol. Chem. in press, 2000)。BAD、Caspase 9、FKHR (forkhead transcription factor) などの分子はこれらのアミノ酸配列を持ち、Aktの生理的条件下での基質として知られている。不活性型BADがAktによりリン酸化され、リン酸化依存的に14-3-3タンパク質と結合し、活性型Bcl-2やBcl-XLなどの細胞死抑制作用のあるタンパク質を遊離する。これらの既知の機能並びに未解明の種々のターゲットを介してAktはアポトーシス抑制制御の中心的な役割を担っていると考えられている (Cell, 96:857-868, 1999)。

【0006】

このようにセリン/スレオニンキナーゼAktは、細胞内タンパク質のセリン又はスレオニン残基を特異的にリン酸化する機能を有しており、該リン酸化機能によって多細胞器官へのシグナル伝達を媒介する役割を担っている。そして、該Aktのリン酸化機能によって細胞内の種々の機構が調節されている。例えば、有糸分裂、細胞増殖、細胞分化、脂質代謝の制御、免疫応答、炎症性応答、グリコーゲンの代謝の制御等、細胞内の種々の機構の調節に関与している。同時に、このことは、癌、肥満症、自己免疫障害、炎症、及び

糖尿病 (II型) のような広範囲な種々の疾患や障害に関与していることを意味する。

【0007】

近年、A k t の活性化が、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、或いは、白血病及びリンパ系腫瘍のような血液系がん等に関与することが報告されている (Annu. Rev. Biochem. 68,965,1999)。これらの悪性腫瘍においては A k t の活性が上昇することから、A k t の活性化がこれらの悪性腫瘍の原因となっていると考えられている。最近、これらのセリン/スレオニンキナーゼの活性を、セリン/スレオニンキナーゼの H J ループの誘導体であるショートペプチドを用いて調節し、上記のような疾患や障害の治療を行う試みもなされている (特表 2002-500649 号公報)。

【0008】

一方で、プロトオンコジーンとして T C L 1 が知られている。T C L 1 は、ヒト T 細胞前リンパ球性白血病 (T-P L L) でその活性が上がることで注目され、これまでに 3 つの類似するサブタイプ (T C L 1、M T C P 1、T C L 1 b) があることが知られている (Oncogene, 8:2475-2483, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12530-12534, 1994)。これらの遺伝子座、14q、32、 χ 28 が T 細胞受容体遺伝子座に転座することによりその発現が活性化され、ヒト白血病 (T-P L L) を起こすことが知られている。しかし、13~16 k D の小さなタンパク質で、これまでに知られている特有な機能構造を持たないことから、その機能は全くわからなかった。

【0009】

生理的条件下でのこれらの分子の発現は、比較的限定されている。T L C 1 発現は、分化早期 (C D 3⁺/C D 4⁺/C D 8⁺) T 細胞、並びに形質細胞分化前までの各種 B 細胞のリンパ系細胞に限られている。また、M T C P 1 の生理的条件下での発現の詳細は不明であるが、最近の遺伝子発現の解析結果から活性化 T 細胞で発現が誘導されていることが確認された。T C L 1 b は、ごく最近クローニングされた分子で、T C L 遺伝子座の極めて近くに存在する。マウスでは 5 種のサブタイプが存在し、ヒトでは 1 種のみが存在すると考えられている。この遺伝子の発現は分化初期の胚芽細胞で非常に高い発現があることが報告されている。

【0010】

T C L 1 の遺伝子はクローニングされ、1324 の塩基配列と 113 の T C L 1 のアミノ酸配列が明らかにされている (米国特許第 5, 985, 598 号明細書)。

【0011】

しかし今まで、T C L 1 の機能については全く分かっていなかった。本発明者らは、A k t 活性化のプロセスを解明する目的で A k t に結合するタンパク質分子を酵母を用いた two-hybrid 法によりヒト B 細胞由来のライブラリーを用いて検索した結果、プロトオンコジーン T C L 1 が A k t と結合することを見い出した。すなわち、T C L 1 が A k t と結合し、多量体を形成し、その多量体の A k t が活性化されることを示し、T C L 1 が A k t の活性化を促す A k t の活性補助因子であることを見い出した (Mol. Cell, 6:395-407, 2000)。更に、本発明者らは、T C L 1 が A k t を介した細胞分裂、細胞死 (アポトーシス) の抑制などを亢進し、白血病やヒトリンパ系の腫瘍の病因となっていることを明らかにし、その後の研究により、細胞内及び細胞外でのリコンビナントタンパクを使った免疫共沈法により、T C L 1 が異種の A k t 分子間での重合形成を促進し、T C L 1 が異種の A k t 分子の間で A k t セリン 472/473 残基のリン酸化を促進することを示し、T C L 1 が A k t を活性化する分子学的な機序を明らかにした (J. Biological Chemistry, 277[5], 3743-3751, 2002)。

【0012】

更に、本発明者らは P C R 法を応用した T C L 1 オンコジーンのアミノ酸ランダムライブラリーを作成し、T C L 1 と A k t の結合並びに T C L 1 の重合形成に必要なアミノ酸部位を同定し、また、T C L 1 のダイマー形成或いは A k t との結合能を欠く変異型 T C L 1 を同定した。そして、この変異型 T C L 1 は A k t を活性化 (in vitro 或いは in vivo とも) する能力を欠き、ミトコンドリア外膜の安定化、細胞死抑制、A k t の核内へ

の移行など T C L 1 の各種機能を失うことを確認した (Molecular and Cellular Biology, 22[5], 1513-1525, 2002)。すなわち、本発明者らはこれまで機能の分からなかったプロトオンコジーン T C L 1 が、A k t の活性補助因子であり、その活性化に A k t との結合、T L C 1 同士の重合形成が必須であることを見出した。

【0 0 1 3】

【特許文献 1】特表 2 0 0 2 - 5 0 0 6 4 9 号公報。

【特許文献 2】米国特許第 5, 9 8 5, 5 9 8 号明細書。

【非特許文献 1】Genes & Dev., 13:2905-2927, 1999。

【非特許文献 2】Annu. Rev. Biochem., 67:481-507, 1998。

【非特許文献 3】Biochem. J., 335:1-13, 1998。

【非特許文献 4】J. Biol. Chem. in press, 2000。

【非特許文献 5】Cell, 96:857-868, 1999。

【非特許文献 6】Oncogene, 8:2475-2483, 1993。

【非特許文献 7】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12530-12534, 1994。

【非特許文献 8】Mol. Cell, 6:395-407, 2000。

【非特許文献 9】J. Biological Chemistry, 277[5], 3743-3751, 2002。

【非特許文献 10】Molecular and Cellular Biology, 22[5], 1513-1525, 2002。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 4】

本発明の課題は、セリンスレオニンキナーゼ A k t (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び該ポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤或いは該ポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 5】

本発明者らは、機能の全く分かっていなかったプロトオンコジーン T C L 1 が、ヒト悪性腫瘍等に関与する A k t に直接結合し、A k t の活性化を促す、すなわち、A k t の活性補助因子であることを明らかにし、更に、白血病やヒトリンパ系の腫瘍等の原因になっていることを明らかにしてきた。また、A k t と結合しない変異型 T C L 1 は A k t を活性化する能力を欠き、ミトコンドリア外膜の安定化、細胞死抑制、A k t の核内への移行など T C L 1 の各種機能を失うことを示してきた。これらの一連の研究から、T C L 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位が A k t と結合する部位であり、該アミノ酸残基のポリペプチド配列を用いることにより、A k t の活性化に伴う細胞の増殖等の特異的に抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 6】

更に、T C L 1 と同様の機能を有する T C L 1 B 及び M T C P 1 においても同様の機能があることを確認し、T C L 1 B のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位、及び M T C P 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位が、A k t の活性化に伴う細胞の増殖を抑制することを見出し、本発明をなした。本発明のポリペプチドは、ホスホイノシチド (phosphoinositide: ホスファチジルイノシトール) の A k t への結合を競合的に阻害する。

【0 0 1 7】

すなわち、本発明は T C L 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 1)、T C L 1 B のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3)、及び M T C P 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 5)、からなり A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードする DNA (配列表の配列番号 2、配列番号 4、又は配列番号 6) からなる。

【0018】

また、本発明は該ポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチド誘導体、及び、それらの配列をコードするDNA、或いは、該配列のDNAにストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを包含する。更に、本発明は、該DNAを発現ベクターに組込んで、組換え発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入して発現することにより、本発明のポリペプチドを製造する方法を包含する。

【0019】

また、本発明は本発明のA k t活性を特異的に抑制するポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含し、更には、本発明のポリペプチドを有効成分とするA k t活性の特異的阻害剤、及び、該ポリペプチドを有効成分とする悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤としての利用を包含する。また、本発明においては、本発明のポリペプチドをコードするDNAを生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、A k tの活性を特異的に抑制する方法を包含する。

【0020】

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号1、配列番号3、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項1）や、配列表の配列番号1、配列番号3、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項2）や、以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子DNA

（a）配列番号1、配列番号3、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（b）配列番号1、配列番号3、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項3）や、配列番号2、配列番号4、又は配列番号6に示される塩基配列又はこれらの配列の一部または全部を含み、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNA（請求項4）や、請求項4記載のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNA（請求項5）や、請求項3～5のいずれか記載のA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを、遺伝子発現ベクターに組込んで構築したことを特徴とする組換え発現ベクター（請求項6）や、請求項6記載の組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現することを経ることを特徴とするA k tの活性を特異的に抑制するポリペプチドを製造する方法（請求項7）からなる。

【0021】

また本発明は、配列表の配列番号1、配列番号3、又は配列番号5のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体（請求項8）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項8記載の抗体（請求項9）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項8記載の抗体（請求項10）からなる。

【0022】

更に本発明は、請求項1又は2記載のポリペプチドを有効成分とするA k t活性の特異的阻害剤（請求項11）や、ポリペプチドがT C L 1のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基10～24の配列であることを特徴とする請求項11記載のA k t活性の特異的阻害剤（請求項12）や、ポリペプチドがT C L 1 Bのタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基8～22の配列であることを特徴とする請求項11記載のA k t活性の特異的阻害剤（請求項13）や、ポリペプチドがM T P 1のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基5～19の配列であることを特徴とする請求項11記載のA k t活性の特異的阻害剤（請求項14）や、A k t活性の特異的阻害が、ホスホイノシチドのA k tへの結合の阻害であることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載のA k t活性の特異的阻害剤

(請求項 15) や、請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤 (請求項 16) や、抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の予防、治療のための薬剤であることを特徴とする請求項 16 記載の抗腫瘍剤 (請求項 17) や、悪性腫瘍の治療が、乳がん、肺がん、白血病、又はリンパ系腫瘍の予防、治療であることを特徴とする請求項 17 記載の抗腫瘍剤 (請求項 18) や、請求項 3～5 のいずれか記載の A k t 活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、A k t の活性を特異的に抑制する方法 (請求項 19) からなる。

【発明の効果】

【0023】

オンコジーン T C L 1 は、A k t (Protein Kinase B) の活性補助因子であり、T C L 1 が A k t に直接結合し、A k t の活性化を促す。本発明において、この T C L 1 のアミノ酸配列の中で、A k t に結合する部位を特定し、該 T C L 1、T C L 1 B、及び M T C P 1 の A k t に結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが A k t の活性を特異的に抑えることを見い出すことにより、本発明のポリペプチドの A k t 活性の特異的阻害剤としての利用を可能とした。これまで A k t の特異的ペプチド阻害剤は知られていないことから、本発明のポリペプチドは、全く新しいタイプの A k t の活性阻害剤としての利用が期待できるものである。A k t の活性は、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、及び白血病或いはリンパ系腫瘍のような血液系腫瘍等の悪性腫瘍に関与することから、本発明の A k t 活性の特異的阻害剤は抗腫瘍剤 (抗癌剤) として、これらの A k t キナーゼの活性化が原因となる様々なヒト悪性腫瘍の予防、治療に用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明は、A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド、すなわち T C L 1 オンコジーンのアミノ酸残基 10～24 のアミノ酸配列、T C L 1 B のアミノ酸残基 8～22 のアミノ酸配列、及び M T C P 1 のアミノ酸残基 5～19 のアミノ酸配列からなるポリペプチドからなり、該アミノ酸配列は配列表の配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 1 に示される。また、本発明は、該ポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド誘導体からなる。T C L 1 オンコジーンのアミノ酸残基配列 10～24 のアミノ酸配列、T C L 1 B のアミノ酸残基 8～22 のアミノ酸配列、及び M T C P 1 のアミノ酸残基 5～19 のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする DNA 配列は、配列表の配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 6 に示される。本発明は、該配列の DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を包含する。

【0025】

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造を基本にして、周知のポリペプチドの合成法によって合成することができる。また、該ポリペプチドをコードする DNA 配列を用いて遺伝子工学操作によって、製造することができる。T C L 1 オンコジーン全体の遺伝子の DNA 配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、米国特許第 5、985、598 号明細書に開示されており、また、その遺伝子及びタンパク質の配列は、GenBank のデータベースでアクセッションナンバー、X82240 及び CAA57708 によってアクセスすることができる。また、T C L 1 の遺伝子の全長 (cDNA 及びゲノム DNA) を組込んだベクターは、米国の微生物の寄託機関である ATCC (American Type Culture Collection) に特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づく微生物の寄託として、受託番号 75923 及び 75924 でそれぞれ寄託されている。

【0026】

T C L 1 B 全体の遺伝子の DNA 配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96 (6), 2949-2951, 1999) に示されてお

り、NCBIのデータベースにおいて、アクセッションナンバー：AF110465によってアプローチすることができる。また、MTC P 1全体の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は文献（Oncogene 8 (9), 2475-2483, 1993）に示されており、NCBIのデータベースにおいて、アクセッションナンバー：BC002600によってアプローチすることができる。

【0027】

本発明のポリペプチドを遺伝子工学操作によって製造するには、上記のようなDNA配列の情報から合成によりDNAを作製するか、或いは、上記のようなTLC 1の遺伝子源から本発明のDNAを制限酵素を用いて切り出して取得し、該遺伝子を適宜の発現ベクターに組み込み、該組換えベクターを宿主細胞に導入し、発現することによって取得することができる。本発明において、種々のポリペプチド誘導体は、該ポリペプチドをコードする塩基配列のDNAを作製し、該DNAを用いて、発現ベクターを構築し、該発現ベクターを公知の適宜の宿主に導入して、発現することにより製造することができる。種々のポリペプチド誘導体をコードするDNA配列の変異は、周知の遺伝子工学的遺伝子変異手段によって行うことができる。

【0028】

本発明のポリペプチドを遺伝子工学操作によって製造するには、該ポリペプチドをコードするDNAを公知の発現ベクターに組み込み、組換え発現ベクターを構築し、これを宿主細胞に導入して発現することにより行う。組換え発現ベクターの宿主細胞への導入は適宜公知の方法を用いることができる。例えば、原核生物の宿主としては、大腸菌、枯草菌、シュドモナス属の菌株を挙げることができ、該原核生物を宿主として使用する場合のベクターとしては、pUC19、pBR322又はpBR327のような大腸菌株等のベクターを用いることができ、プロモーターとして、例えばトリプトファン・プロモーター、P_Lプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を用いることができる。

【0029】

真核微生物の宿主としては、酵母が一般に広く用いられ、発現ベクターとしては、例えばYRp7等を用いることができる。高等動物の培養細胞を宿主とする場合には、COS細胞、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）等を用いることができる。プロモーターとしては、例えばアデノウイルス2主後期プロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルス、ラウスザルコーマウイルスからのプロモーターを、マーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、メトトレキセート耐性ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子等を用いることができる。その他、BmN4細胞、Sf9細胞、Sf21細胞等の昆虫細胞を宿主として用いることができる。

【0030】

本発明においては、TCL 1のアミノ酸残基10～24のアミノ酸配列からなるポリペプチド等、本発明のポリペプチドを用いることにより、ホスホイノシド（ホスファチジルイノシトール）との結合を阻害する結果、Akt（protein Kinase B）活性、細胞増殖、抗腫瘍効果を得ることができる。

【0031】

このペプチドは、リコンビナント蛋白としての投与、ウイルスベクターを用いた投与方法、哺乳類発現ベクターを用いた投与方法が考えられる。TATペプチド（HIVウイルスの蛋白の一部）との融合法によるペプチドの導入法も利用できる。その他、エレクトロポレーション、薬理学的に考えられる細胞内導入法を用いることもできる。

【0032】

ペプチドの安定化を図る意味でのペプチドの修飾、PEG（polyethylene Glycol）、FCR（FC Receptor）、他のペプチドとの融合ペプチドの作製などを用いることができる。

【0033】

本発明は、TCL1のアミノ酸残基10～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号2に示される塩基配列）、TCL1Bのアミノ酸残基8～22のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号4に示される塩基配列）、又はMTCP1のアミノ酸残基5～19のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号6に示される塩基配列）とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAktの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを包含する。

【0034】

ここで、「塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

【0035】

本発明は本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。本発明の抗体は、TCL1、TCL1B、又はMTCP1のAktへの結合部位に特異的に結合することにより、TCL1、TCL1B、又はMTCP1のAktへの結合を特異的に阻害することが考えられる。また、本発明の抗体はTCL1、TCL1B、又はMTCP1ポリペプチドとの抗原抗体反応により、組織細胞、血清などにおけるTCL1、TCL1B、又はMTCP1遺伝子に関わる疾患の検出に用いることができる。本発明の抗体を用いた免疫学的測定には、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

【0036】

本発明においては、本発明のポリペプチドを有効成分として、Akt活性の特異的阻害剤として、及び、該ポリペプチドを有効成分として、悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤として用いる。

【0037】

本発明のポリペプチドを有効成分として、Akt活性の特異的阻害剤として、及び、悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤として用いるには、該ポリペプチドをそれ単独で、或いは、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することにより製剤化して用いることができる。これらのAkt活性の特異的阻害剤又は悪性腫瘍等の予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

【0038】

本発明のAktの活性を特異的に抑制するポリペプチドを癌などの予防・治療に用いる場合は、タンパク質、ペプチド又は抗体などの巨大分子と非共有結合体を形成し、ポリペプチドの構造を変化させ、ポリペプチドの分子を細胞内にデリバリーすることができるChariot (Active Motif社製)等の細胞毒性のない試薬を用い、Aktの活性を特異的に抑制するポリペプチドを癌細胞に直接接種することができる。なお、投与量は、疾病の種類、患者の体重、投与形態等により適宜選定することができる。

【0039】

本発明のAkt活性の特異的阻害剤又は抗腫瘍剤の投与の対象としては、Aktの活性化が原因となる各種疾病の予防或いは治療を挙げることができ、特に、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、及び白血病或いはリンパ系腫瘍のような血液系腫瘍等の悪性腫瘍の予防、治療を挙げることができる。

【0040】

本発明においては、本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、Aktの活性を特異的に抑制することができる。

【0041】

該Akt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを生体細胞に導入するための動物細胞用発現ベクターとしては、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAが動物細胞用ベクターにインテグレートされているものであればどのようなものでもよく、かかる動物細胞用ベクターとしては、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAを宿主細胞内で発現させることができる発現系であれば特に制限されない。例示すれば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。

【0042】

これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。また、本発明の動物細胞用発現ベクターには、リポソームも含まれる。これら動物細胞用ベクターの中でも、アデノウイルスベクターが、安全性や使用の便からして特に好ましい。

【0043】

癌などの予防・治療においては病変部位に直接（インサイチュウ）投与することが好ましく、例えば、アデノウイルス発現ベクターを利用する場合は、癌組織等の病変部位に該ベクターの懸濁液を直接接種することができる。また、本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを収納したリポソームを用いる場合も、癌組織等の病変部位に該リポソームの懸濁液を直接接種することができる。

【0044】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0045】

[Akt及びTCL1結合配列の同定]

酵母two-hybridスクリーニング及び β -Galリフティングアッセイを用いてアミノ酸部分変異TCL1クローンとAktとの相互作用について測定した（MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Mar. 2002, P. 1513-1525）。

【0046】

[Akt-TCL1相互作用の欠損に対するTCL1ランダムミュテーションライブラリースクリーニング]

(材料及び方法)

1. TCL1ライブラリー

pGAD424（Clontech社）中のヒト全長TCL1を、5'-CCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTTCATG及び5'-ATTTCATAGATCTCTGCAGGTCGACGGATCCCTCAからなるフランキングTCL1配列のプライマーを用いてPCRで増幅し、ランダムTCL1ライブラリーを調製した。

【0047】

2. TCL1 の部位特異的突然変異誘発

TCL1 のアミノ酸置換変異体 (D16G、K30M、Q46R、174V、M106V、36-38A、又は 36A/38Δ) を下記のプライマーを用いて、PCR によって調製し、天然型と変異型を pGAD424 (Clontech社)、pME18SHA (Mol. Cell 16:395-407)、又は pCMV Flag (Kodak社) 発現ベクターにサブクローンした。pGEX4T2-D16G、TCL1 及び pGEX4T2-36-38A、TCL1 を、pGAD424 からの相当する cDNA からサブクローニングによって調製した。全塩基配列は、所定の実験の前に確認した。

【0048】

用いたプライマーは次のとおり (変異したコドンは、小文字で示した) : D16G に対しては、5'-ATG GCC GAG TGC CCG ACA CTC GGG GAG GCA GTC ACC GAC CAC CCG ggc CGC CTG TGG GCC; K30M に対しては、5'-GTG TAT TTG GAC GAG atg CAG CAC GCC TGG CTG; Q46R に対しては、5'-G ATA AAG GAT AGG TTA cgg TTA CGG GTG CTC TTG; 174V に対しては、5'-CCA AGC CTG CTG CCT gtc ATG TGG CAG CTC TAC; M106V に対しては、5'-ATC ATC GGA TCC TCA GTC ATC TGG CAG CAG CTC GAG AAG cac GTC CTC C; 36-38A に対しては、5'-CAG CAC GCC TGG CTG gcc gcg gcc ATC GAG ATA AAG GAT 及び逆相補配列; 及び 36A/38Δ に対しては、5'-GCC TGG CTG gcc TTA ATC GAG ATA 及び逆相補配列。TCL1 のアミノ酸置換変異体 (D16G、K30M、Q46R、174V、M106V、36-38A、又は 36A/38Δ) の変異位置を図 1 に示す。

【0049】

3. 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

TCL1 及び Akt タンパク質の相互作用を検出するために、酵母ツーハイブリッドタンパク質相互作用検出システムによるスクリーニングを行った。

【0050】

Y190細胞 (Clontech社) を、リチウムアセテート法を用いて、既報 (Mol. Cell 6:395-407; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11534-11539) に準じて、ヒト Akt2 (Akt2/PAS2-1) 及び TCL1 ランダムライブラリーをコトランスフォームした。3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾール (SIGMA社) の存在下に、cDNA ライブラリーからの約 10^4 個のクローンをスクリーニングした。

His⁺コロニーをフィルターリフトアッセイ (filter-lift assay) を用いて、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) 活性について測定した。酵母クローンは β -Gal の強度により、3-h-ポジティブ (++)、8-h-ポジティブ (+)、及び 24-h-ネガティブ (-) クローンのカテゴリーに分類した。ヌクレオチドのシーケンシングのために、それぞれのカテゴリーから 10 クローンを選択した。

【0051】

4. 定量的 β -Gal アッセイ

Y190細胞 (Clontech社) を、天然型、D16G、K30M、Q46R、174V、M106V の TCL1 と共に、Akt2/PAS2-1 を用いて、pGAD424 (Clontech社) ベクターにより、コトランスフォームした。TCL1 変異体は、PCR ベースの部位変異 (PCR-based site-directed mutagenesis) 及び/又は Quikchange キット (Stratagene社) 生成した。液体 β -Gal アッセイは、ONPG (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; Sigma社) を用いて行った (Mol. Cell 6:395-407)。示された値は、ウェスタン ブロット分析 (GAL4 活性化ドメイン抗体 [Ab]: Clontech社) によって決定される、各々の酵母のトランスフォーマントの発現によって標準化された。

【0052】

[実験及び結果]

Akt-TCL1相互作用をもたらすアミノ酸残基を決定するために、PCR-介在ランダム変異によるランダムTCL1ライブラリーを調製した。置換されたdATPは1.4%、dTTPは3.8%、dGTPは4.0%、及びdCTPは1.4%の発生率であった。このライブラリーにおけるヌクレオチド置換の総頻度は、2.7%であり、挿入-削除率0.09%であった。ライブラリーのサイズは、約 2.5×10^4 bp. であった。置換部位は、シーケンスされた25サンプルクローンにおいて、全分子の90%以上に分散していた。

【0053】

次に、各々のクローンとAkt2との相互作用を調査するために、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。生存する酵母クローンは、 β -Galリフティングアッセイにおけるブルーカラー反応の強度に基づいて3つのカテゴリーに分類された(3hで β -Galポジティブ[++]、8hで β -Galポジティブ[+]、及びネガティブ[-])。各々のカテゴリーの10クロンのヌクレオチド配列を決定した。++クロンは、野生型TCL1又はP5、P15、D43、L45、P61、M75、及びD88部位の変異体を含んでおり、該クローンは β -Gal活性に影響を与えず、該残基はAkt相互作用に対して反応しなかった。観察された、Aktと低い相互作用(8hポジティブ[+])を示す10クロンのアミノ酸置換体は、TCL1のアミノ酸配列と並べて示した(図1)。

【0054】

これらのクローンの中で、特定の残基において、明らかに置換体の堆積が見い出された。10クロンのうちの9クロンにおいて、D16、K30、Q46、I74、又はM106におけるアミノ酸の少なくとも1つにおいて置換体が見い出された。ネガティブクローン(-)は、何の挿入、大量の削除を伴う挿入、構造シフト、及び/又は大量の変異体を含まなかった。それ故に、それ以上の分析から除外した。

【0055】

本発明者は、低下したAkt相互作用を示したクローンは、Akt-TCL1相互作用を介在する決まった残基を含むに違いないと仮定した。そこで、部位特異的突然変異誘発を用いて、TCL1に個々の変異体(D16G、K30M、Q46R、I74V、又はM106V)を導入した。D16G及びI74V変異体は、 β -Galリフティングアッセイ(図2)及び、定量的液体 β -Galアッセイ(図3)に示されるように、Aktとの結合が劇的に低下する結果となった。

【0056】

(TCL1-誘導Akt活性化に必要な、Akt及びTCL1ホモダイマーによる会合)
in vitro キナーゼアッセイにおいて、野生型TCL1は、Aktキナーゼ活性を増大した。このことは、Aktの増加したSer-473リン酸化と良く関連付けられた。しかしながら、D16G-TCL1は、薬量エスカレーション試験において、Aktキナーゼ活性に関して、影響がなかった(図4)。D16G-TCL1が、GSK-3 α リン酸化により試験した時に、明確に、Aktキナーゼ活性を高めることができなかったのに対し、Akt-Ser-473リン酸化も誘発することができなかった。同様に、Aktに結合するが、ホモダイマーを形成しない36-38A-TCL1は、in vitroキナーゼアッセイにおいて、リン酸化GSK-3 α 及びSer-473-Aktの安定化レベルによって示された時に、Aktキナーゼ活性を高めることができない(図5)。これらのことから、Aktと結合しない変異型TCL1は、Aktの活性化する能力(in vitro及びin vivoとも)を欠くことを示した。

【0057】

(Akt及びTCL1結合配列の作製)

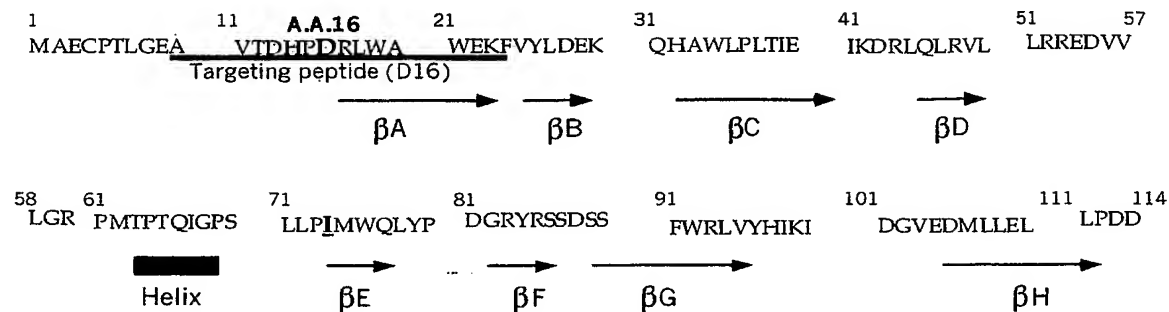
これまでに行われていたTCL1の結晶構造の解析結果から(Molecular and Cellular Biology, Mar.2002, p.1513-1525)、D16は第一 β シートの最初の部位に存在し、この第一 β シートと第4 β シートで作られる平面上にAktキナーゼが結合することが考えられた。

【0058】

これらの一連の研究に基づき、TCL1 蛋白分子における Akt との結合アミノ酸、第 16 残基 (Asparadic Acid) 近傍の TCL1 オンコジンのアミノ酸残基配列 10-24 (表 1) が、Akt と結合し、Akt の活性化を抑制するインヒビターとなりうるのではないかと考えた。

【0059】

【表 1】



【0060】

上記仮定に基づき、この TCL1 と AKT の結合部近傍のペプチド、すなわち、TCL1 のアミノ酸残基 10-24 (「10/24」と表示する。) 近傍のペプチド並びにコントロールペプチドの二つのペプチドを作製した (表 2)

ペプチドは、通常のペプチド合成機で作製しており、ゲル濾過又は HPLC で精製してある。北海バイオシステム、米国企業で作製されたものを用いた。

【0061】

【表 2】

標的ペプチドデザイン

	NH ₂ -TAT (YGRKKRRQRRR)-	Flag(DYKDDDDK)-	Target Peptides	-COOH
10/24 peptide	NH ₂ -YGRKKRRQRRR-	DYKDDDDK-	AVTDHPDRLWAWKEF	-COOH
Control Peptide	NH ₂ -YGRKKRRQRRR-	DYKDDDDK-	SQAVHAAHEI	-COOH

【実施例 2】

【0062】

[TCL1 の 10/24 ペプチドのアッセイ]

1. MTT アッセイを用いた細胞増殖試験

MTT アッセイを用いた細胞の増殖試験を行った。すなわち、WST-8 試薬 [2- (2-methoxy-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-disulfophenyl) -2H-tetrazolium, monosodium salt] (347-07621, Dojin, Kumamoto, Japan) アッセイを用いた細胞の増殖実験において、この TCL1 オンコジンのアミノ酸残基配列 10/24 ペプチド (NH₂- - AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) が AKT 活性化に伴う細胞の増殖を特異的に抑制することを確認した (図 6)。

【0063】

この方法では、T4細胞株を用いた無刺激下での細胞増殖試験で10/24ペプチドを0-50 μ Mの濃度で前処置し、48時間後にWST-8試薬アッセイ法を用いてその増殖能を測定し、450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いたELISA法により (Model 550; BioRad, Tokyo, Japan) 測定した。

【0064】

同様なAktキナーゼ活性抑制効果は10-24 (AVTDHPDRLWAWKEF) のうちの11-23の繰り返し配列を持つペプチド (NH₂- VTDHPDRLWAWEK -RRR- VTDHPDRLWAWEK -COOH) を用いても認められた。

【0065】

2. 免疫共沈法による結合試験

10/24ペプチドの特異的な細胞増殖抑制の原因を調査するために、免疫共沈法を用いて、10/24ペプチドがAktキナーゼと特異的に結合することを確認した (図7)。

【0066】

この方法では、AKTキナーゼをヒト293細胞に過剰発現し、採取した細胞溶液を10/24ペプチド (NH₂- AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) と約2時間インキュベーションする。更に、この処置を行った細胞溶液に、Aktに融合したエピトープに対する特異抗体の結合したアガロースビーズを加え、2-3時間共インキュベーション (co-incubation) した。

【0067】

その後、この抗体の結合したアガロースビーズを用いて付着する細胞溶液中の分子を免疫沈降し、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、Aktキナーゼとの結合を確認した。

【0068】

2. 脂質-タンパク プルダウンアッセイ

TCL1の10/24ペプチドについて、脂質-タンパク プルダウンアッセイ (Lipid-protein pull down assay) を行った。

【0069】

方法: 脂質-タンパク プルダウンアッセイはPIP Beads (PI (3,4,5) P3 Echelon Bioscience Incorporated) を使って行った。10/24 NH₂-AVTDHPDRLWAWKEF-COOH またはコントロールとして β C (NH₂-EKQHWLPLTIE-COOH) を用いた。50 ngのAKT kinase (unactivated, Upstate Biotechnology, #14-279) を用いて2時間4℃で処置後に25 μ lのPIP Beads (PI (3,4,5) P3 Echelon Bioscience Incorporated) を加えて (10 mM Hepes, pH 7.4, 0.25% NP-40, 140 mM NaCl) を含む溶液で洗浄後、Akt抗体 (Cell Signaling) を使ってウエスタンブロットを行った (図8)。図左側の3つのレーンでは、1-400 μ MでAKTとの結合をDose-Dependentに抑制しており、図右側のコントロールペプチドでは全く抑制していない。

【0070】

これらの結果から、このペプチド (NH₂- AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) はAktキナーゼに対するホスホイノシチド (Phosphoinositide: (PI (3,4,5) P3) の結合を競合的に抑制することが確認された。したがって、これがAkt活性化抑制の機序と考えられた。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】本発明の実施例の試験において、構築し、観察された、Aktと低い相互作用 (8 h ポジティブ [+]) を示す10クローンのアミノ酸置換体について、TCL1のアミノ酸配列と並べて示した図である。

【図2】本発明の実施例の試験において、部位特異的突然変異誘発を用いて導入したTCL1の変異体 (D16G、K30M、Q46R、I74V、又はM106V) と野生型TCL1を用いて、 β -Galリフティングアッセイを行った結果を示す図で

ある。

【図 3】本発明の実施例の試験において、部位特異的突然変異誘発を用いて導入した T C L 1 の変異体 (D 1 6 G、K 3 0 M、Q 4 6 R、I 7 4 V、又は M 1 0 6 V) と野生型 T C L 1 を用いて、定量的液体 β -G a l アッセイを行った結果を示す図である。

【図 4】本発明の実施例の試験において、T C L 1-誘導 A k t 活性化に必要な、A k t 及び T C L 1 ホモダイマーによる会合を調べるために、野生型 T C L 1 について、in vitro キナーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図 5】本発明の実施例の試験において、T C L 1-誘導 A k t 活性化に必要な、A k t 及び T C L 1 ホモダイマーによる会合を調べるために、変異 T C L 1 (3 6 - 3 8 A T C L 1) について、in vitro キナーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図 6】本発明の実施例の試験において、A K T 活性化に伴う細胞の増殖を特異的に抑制することを確認するために、T L C 1 オンコジーンのアミノ酸残基配列 1 0 / 2 4 ペプチドを用いて M T T アッセイを行った結果を示す図である。

【図 7】本発明の実施例の試験において、1 0 / 2 4 ペプチドの特異的な細胞増殖抑制の原因を調査するために、免疫共沈法を用いて、1 0 / 2 4 ペプチドの A k t キナーゼとの特異的結合を確認した結果を示す図である。

【図 8】T C L 1 の 1 0 / 2 4 ペプチドについて行われた脂質-タンパク プルダウンアッセイ (Lipid-protein pull down assay) の結果を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and technology Agent

<120> polypeptide specifically inhibit Akt activity

<130> Y2003-P070

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Lys	Phe
1				5				10						15

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcagtcaccg accacccgga ccgcctgtgg gcctgggaga agttc

45

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Ala	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Pro	Gly	Arg	Leu
1				5				10						15	

Trp	Ile	Gln	Arg	Pro	Gly	Ile	Tyr	Glu	Asp	Glu	Glu	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 4

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggcctccg aagcttctgt gcgtctaggg gtgccccctg gccgtctgtg gatccagagg 60

cctggcatct acgaagatga ggaggggaga 90

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Gly	Ala	Pro	Pro	Asp	His	Leu	Trp	Val	His
1				5				10						15	

Gln	Glu	Gly	Ile	Tyr	Arg	Asp	Glu	Tyr
			20				25	

<210> 6

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atggcaggag aggatgtggg ggctccaccc gatcacctct gggttcacca agagggtatc 60

taccgcgacg aatac 75

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccaccaaacc caaaaaaaga gatcgaattc atg 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

attcatagat ctctgcaggt cgacggatcc tca

33

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggccgagt gcccgcact cggggaggca gtcaccgacc acccgggccg cctgtgggcc 60

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gtgtatttgg acgagatgca gcacgcctgg ctg 33

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gataaaggat aggttacggt tacgggtgct cttg 34

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ccaagcctgc tgcctgtcat gtggcagctc tac 33

<210> 13

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atcatcggat cctcagtcac ctggcagcag ctcgagaagc acgtcctcc 49

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

cagcacgcct ggctggccgc ggccatcgag ataaaggat

39

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gcctggctgg ccttaatcga gata

24

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

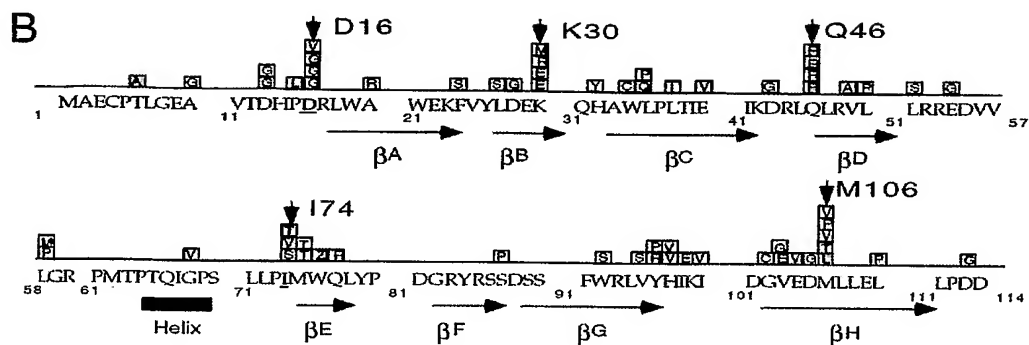
<400> 16

Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Lys	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15	

Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Lys
			20					25				

【書類名】 図面

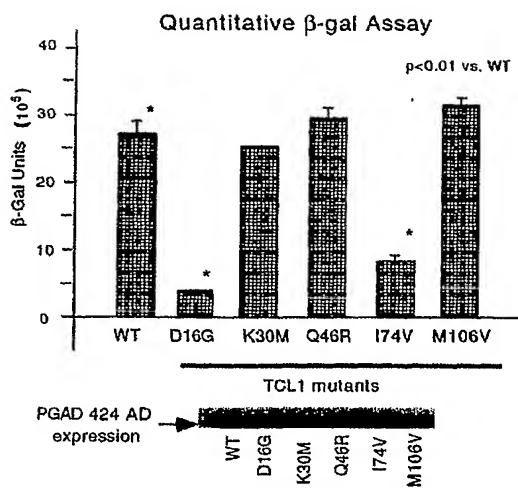
【図 1】



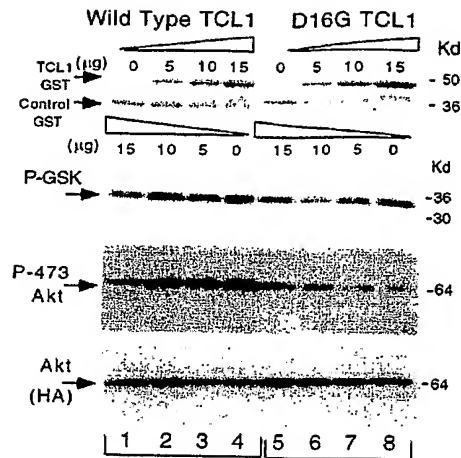
【図 2】

	Clone 1	Clone 2	Clone 3
TCL1 D16G			
TCL1 K30M	+	+	+
TCL1 Q46R	+	+	+
TCL1 I74V			
TCL1 M106V	+	+	+
TCL1 Wild Type	+	+	+

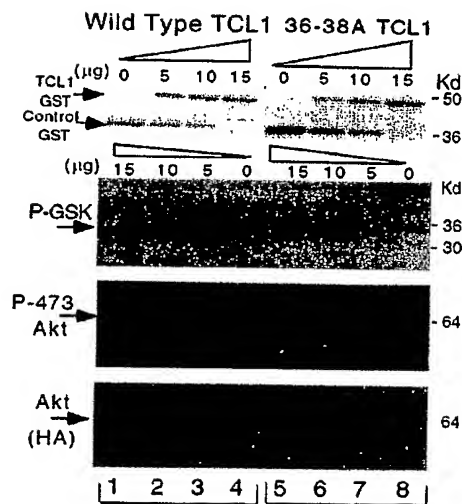
【図 3】



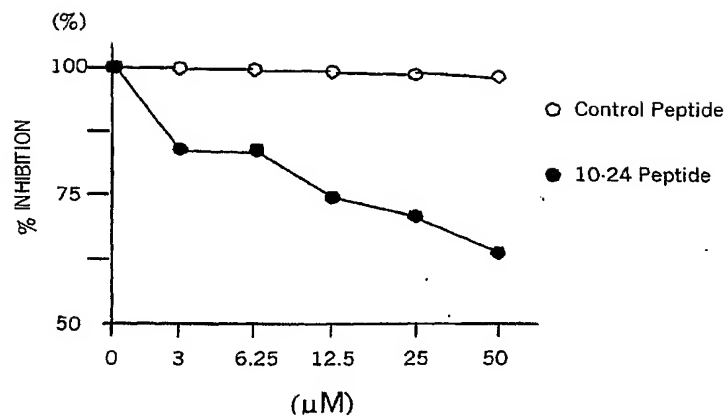
【図 4】



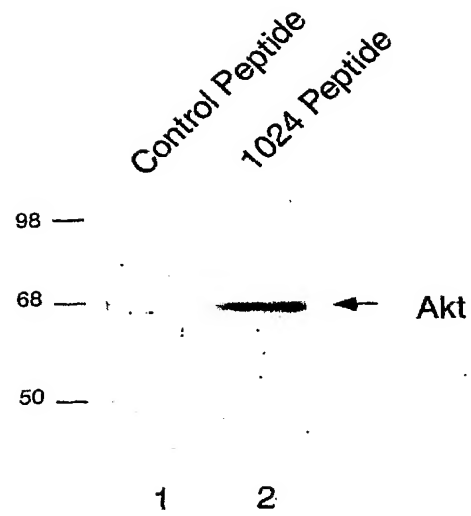
【図 5】



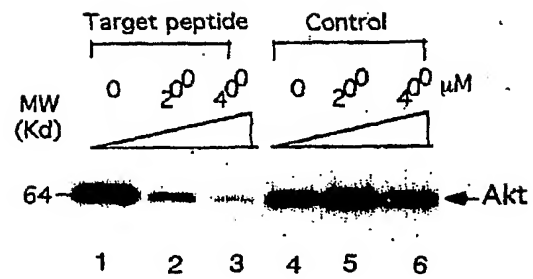
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 A k t (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、その DNA、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び該ポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の阻害剤或いは抗腫瘍剤等を提供すること。

【解決手段】 該ポリペプチドは、T C L 1 のアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位、T C L 1 B のアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位、M T C P 1 のアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位に相当するアミノ酸配列（配列表の配列番号 1、3、及び 5）、及びそのポリペプチド誘導体からなる。更に、本発明は、該ポリペプチドをコードする DNA（配列表の配列番号 2、4、及び 6）、及び該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。本発明のポリペプチドは、ホスホイノシドと A k t との結合を阻害し、A k t の活性を特異的に抑制し、A k t 活性の阻害剤或いは抗腫瘍剤等として用いることができる。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人科学技術振興機構